

柠檬酸钠对枯草杆菌生长代谢及肌苷积累的影响

刘新星 陈双喜 储 炬* 庄英萍 张嗣良

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

摘 要 :研究柠檬酸钠对枯草杆菌生长代谢及产苷的影响,在基础料中添加浓度为 0.2g/L 的柠檬酸钠,肌苷产量提高 18%,肌苷对葡萄糖得率增加 38%。通过分析糖代谢途径中关键酶的酶活,结果表明添加柠檬酸钠改变了一些关键酶的活力,可降低糖酵解途径中 6-磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶的活力,从而减弱了糖酵解途径的通量。

关键词 :肌苷 柠檬酸钠 丙酮酸激酶 糖酵解通量

中图分类号 :Q841 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2004)05-0627-04

在芽孢杆菌嘌呤核苷合成的代谢途径已经清楚的前提下, Muzzio 等^[1]通过代谢途径分析,以定量化学计量方法计算出嘌呤核苷合成的理论得率应该为 1g 核苷/g 葡萄糖以上; Sauer 等^[2]综合考虑菌体自身的生长代谢的情况下计算得出枯草芽孢杆菌生产核苷的得率也在 0.5g 核苷/g 葡萄糖左右,都远大于目前实际的发酵水平,其研究潜力仍然很大。在肌苷发酵生产中,葡萄糖是重要的营养物质。 Majewski 和 Domach^[3]用限制性网络分析与相关酶活相关联的代谢流,指出在大肠杆菌和枯草杆菌中糖酵解相对于三羧酸循环要过量,糖酵解途径(EMP)通量超出了三羧酸循环(TCA)代谢的能力,从而 EMP 生成的丙酮酸会发生积累,并且会通过其它途径进行代谢以缓解持续的“溢流”。因此就会出现过量碳的溢流,导致酸和其他物质的生成。文献报道^[4]枯草杆菌中,在连续培养时柠檬酸和葡萄糖的联合代谢会阻碍有机酸等副产物的生成,糖酵解途径减弱。这是因为加入柠檬酸时可增加钙离子的吸收,而钙离子是丙酮酸激酶(Pyruvate Kinase, PK, E. C. 2.7.1.40)的强烈抑制剂。代谢物中磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)比不加时提高 6 倍,在大多数细菌中, PEP 是磷酸果糖激酶(Phosphofructokinase, PFK, E. C. 2.7.1.11)的强烈抑制剂。本文的研究表明,柠檬酸钠的添加可减少糖耗速率,显著降低了丙酮酸激酶和磷酸果糖激酶的活力,从而减弱糖酵解途径通量,使肌苷产量和糖苷转化率有了大幅度提高。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 枯草杆菌(*Bacillus subtilis*) 306 # (A⁻,

8-AG^r)由广东肇庆星湖科技股份有限公司提供。

1.1.2 摇瓶培养基 :每升中含有葡萄糖 110g、酵母膏 14g、KH₂PO₄ 5g、硫酸铵 15g、硫酸镁 2g、CaCO₃ 20g、尿素 5g、玉米浆 10g,消前 pH6.8。

1.1.3 试剂 :6-磷酸果糖,乙酰辅酶 A,磷酸烯醇式丙酮酸均为 Sigma 产品;NAD、NADH、ADP、ATP 均为进口分装生化试剂,其余试剂均为分析纯。

1.2 摇瓶培养方法

装量为 20mL/500mL 三角瓶,接种量 10%,37℃于旋转式摇床培养 56h,放瓶时根据培养前后重量差补水。

1.3 酶液的制备

取 5mL 发酵液于 4℃,4000r/min 离心 20min,沉淀用 5mL 磷酸盐缓冲液(pH7.0)充分混匀后在上述相同条件下离心,弃上清继续用磷酸盐缓冲液清洗再离心。上述处理后的沉淀中加入 5mL 磷酸盐缓冲液,DNA 酶(2.5mg/mL)25 μ L,溶菌酶(25mg/mL)300 μ L,充分混匀在 37℃水浴振荡 30min,于 4℃8000r/min 离心 20min,上清即为细胞裂解液。

1.4 测定方法

1.4.1 测定细胞干重 :取 5mL 发酵液,3000r/min 下离心,沉淀于 100℃下烘 24h 至恒重,称重。

1.4.2 测定葡萄糖、肌苷和氨基氮 :葡萄糖用含葡萄糖氧化酶试剂盒测定。肌苷的测定,HPLC 法。色谱条件:流动相为 0.5% KH₂PO₄,波长为 254nm,流速为 1.2mL/min(高效液相色谱仪型号 Agilent1100,色谱柱 Hypersil ODS 型 C18 反相柱,柱长 40mm \times 250mm)。采用甲醛法测定氨基氮。

1.4.3 测定酶液中蛋白 :考马斯亮兰法。

1.4.4 测定酶活 :葡萄糖激酶按 Postma 等^[5]的方

基金项目 :上海市曙光计划资助项目(01SG28)

* 通讯作者。Tel 86-21-64243021 Fax 86-21-64253702 E-mail juchu@online.sh.cn

作者简介 刘新星(1976-)女,湖北蒲圻人,硕士研究生,主要从事微生物代谢调控与过程优化研究。E-mail jily-xing4567@yahoo.com.cn

收稿日期 2004-01-17,修回日期 2004-04-16

法。磷酸果糖激酶按 Alves 等^[6]的方法。丙酮酸激酶按 Malcovati 等^[7]的方法。柠檬酸合成酶按 Fortnagel 等^[8]的方法。6-磷酸葡萄糖脱氢酶按 Horne 等^[9]的方法。所有酶活由 UNICO UV-2102PC 型紫外/可见分光光度计测定(尤尼柯上海仪器有限公司)

1.4.5 有机酸检测:HPLC法。色谱条件:pH为2.3的磷酸溶液,流速0.5mL/min,波长为210nm。(高压液相色谱仪型号 Agilent1100,色谱柱 Aquasep型 C18 反相柱 柱长 25cm×4.6mm)标品分别为丙酮酸、柠檬酸、乙酸、琥珀酸、丁酸。

2 结果和讨论

2.1 柠檬酸钠对发酵过程的影响

在一组培养基中添加0.2%的柠檬酸钠,对照组不添加,每隔4h取3个平行,研究柠檬酸钠对枯草杆菌细胞生长、肌苷产率及pH的影响。

2.1.1 柠檬酸钠对细胞生长、肌苷产量和pH的影响图1结果表明,添加柠檬酸钠时肌苷产量有明显提高,56h时添加柠檬酸钠比不添加柠檬酸钠的肌苷产量提高了18%。从pH曲线可以看出,两者初始pH值相同,并在细胞前期生长过程中下降,这是因为培养基中存在有 $(NH_4)_2SO_4$ 的缘故,随着 NH_4^+ 的利用pH不断下降,随后由于菌体的旺盛代谢,会持续产生有机酸等代谢产物,其分泌到发酵液中会导致pH的持续下降。但添加柠檬酸钠时pH下降趋于缓慢,在发酵过程中pH最低值为6.32,是因为添加柠檬酸钠可以减少乙酸、丙酮酸等有机酸的生成(图2)。不添加柠檬酸钠的pH降低明显,最低值为6.0。两者pH在后期都有回升,是因为葡萄糖逐渐被消耗利用完,菌体的生长代谢减弱导致大量菌体自溶时内含物释放引起的。

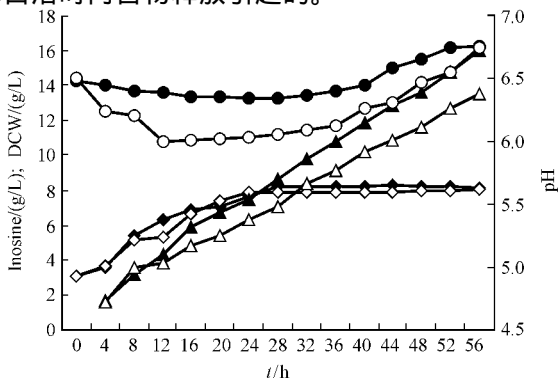


图1 柠檬酸钠对细胞生长、肌苷产量及pH的影响

Fig.1 The effect of sodium citrate on the cell growth, inosine production and pH

◆: Dry cell weight (sodium citrate added); ◇: Dry cell weight (sodium citrate not added); ▲: Inosine (sodium citrate added); △: Inosine (sodium citrate not added); ●: pH (sodium citrate added); ○: pH (sodium citrate not added).

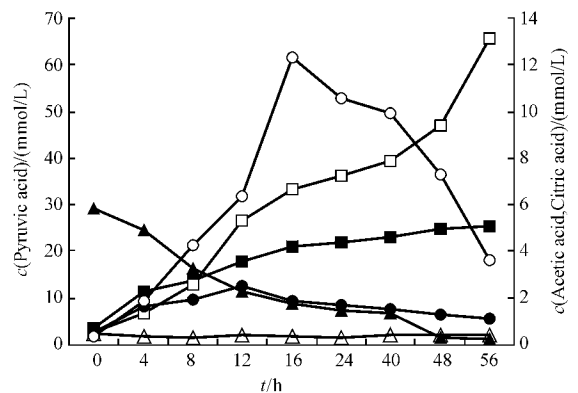


图2 柠檬酸钠对有机酸代谢的影响

Fig.2 The effect of sodium citrate on the metabolism of organic acids
▲: Citric acid (sodium citrate added); △: Citric acid (sodium citrate not added); ■: Acetic acid (sodium citrate added); □: Acetic acid (sodium citrate not added); ●: Pyruvic acid (sodium citrate added); ○: Pyruvic acid (sodium citrate not added).

2.1.2 发酵过程中有机酸变化规律:由有机酸测定结果可知乙酸、丙酮酸是肌苷发酵过程中主要的有机酸副产物,从图2可分析发酵液上清中乙酸的含量是不断增加的。不添加柠檬酸钠时56h乙酸含量为65.55mmol/L,添加柠檬酸钠时56h乙酸含量为25.34mmol/L,表明柠檬酸钠的添加可以抑制副产物乙酸的生成。丙酮酸在发酵前期是不断增加的,但从24h左右又开始减少,这是因为丙酮酸开始转化成为丙氨酸,丙氨酸是肌苷发酵生产中主要的氨基酸副产物。添加柠檬酸钠时,丙酮酸的合成量减少,12h只有2.52mmol/L,而不添加则有6.33mmol/L。因此,柠檬酸钠的添加抑制了丙酮酸的生成。添加柠檬酸钠时柠檬酸会慢慢被消耗,不添加柠檬酸时,则发酵液中柠檬酸含量极低,这表明柠檬酸只是代谢中间物。

2.1.3 添加柠檬酸钠对糖耗及氨基氮含量的影响:从图3葡萄糖的变化曲线可看出,添加柠檬酸钠时,葡萄糖消耗变得缓慢,56h的残糖下降为1.6g/L,而对照组残糖已下降为0.45g/L。图3中分析氨基氮的变化可以看出,在发酵初期由于菌体的生长需要,培养基中的氮源不断减少,当菌体进入平衡期后(约16h),氮源的利用减慢,但到发酵中后期(约40h),氨基氮含量有所回升,有可能是菌体自溶内含物释放所致,也可能是后期有丙氨酸等氨基酸副产物生成。加柠檬酸钠时,氨基氮回升程度显著减缓。

2.2 两种培养条件下肌苷对葡萄糖得率系数,葡萄糖的比消耗速率以及产物的比生成速率的比较

表1列出的是在整个发酵过程中,不同时间段的葡萄糖比消耗速率,肌苷比生成速率及肌苷对葡萄糖的得率系数。表中数据表明,在整个发酵过程的不同时段,加柠檬酸钠时的葡萄糖比消耗速率比

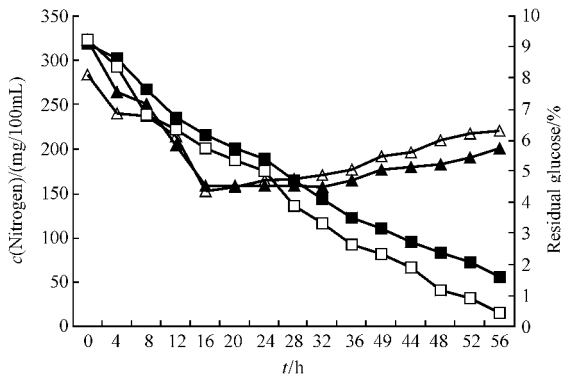


图3 柠檬酸钠对糖耗和氨基氮的影响

Fig.3 The effect of sodium citrate on the glucose consumption and NH_2N
 ▲ : $\text{NH}_2\text{-N}$ (sodium citrate added); △ : $\text{NH}_2\text{-N}$ (sodium citrate not added)
 ■ :Residual glucose(sodium citrate added); □ :Residual glucose (sodium citrate not added).

不加柠檬酸的要小,说明柠檬酸钠的添加会导致葡萄糖消耗量降低。发酵最初 12h 由于菌体生长需要消耗大量葡萄糖,所以两种情况下的葡萄糖比消耗速率比后期都要大,其中不添加柠檬酸钠的比消耗速率比添加时要大 36%。分析两种情况下的肌苷比生成速率可以发现在发酵前期(12h)两种情况下的产物比生成速率相差不大,但后期添加柠檬酸钠的肌苷比生成速率比不添加明显要大,原因是因为柠檬酸钠对菌体生长影响不明显,但能提高肌苷产量。添加柠檬酸钠时肌苷产量增加而糖耗减少,所以不同时段肌苷对葡萄糖的得率系数比不加要大得多。加柠檬酸钠时肌苷对葡萄糖总转化率为 0.213 (表中未列出),不加柠檬酸时肌苷对葡萄糖的总转化率只有 0.154 糖苷转化率提高了 38%。

表1 添加柠檬酸钠对 $Y_{P/S}$, Q_S and Q_P 的影响

Table 1 The effect of sodium citrate on the $Y_{P/S}$, Q_S and Q_P

t/h	$Y_{P/S}$		$Q_S(\text{h}^{-1})$		$Q_P(\text{h}^{-1})$	
	Sodium citrate added	Sodium citrate not added	Sodium citrate added	Sodium citrate not added	Sodium citrate added	Sodium citrate not added
12	0.181	0.132	0.42	0.57	0.076	0.076
24	0.232	0.183	0.162	0.195	0.038	0.036
40	0.195	0.148	0.176	0.207	0.035	0.029
56	0.267	0.176	0.117	0.148	0.031	0.028

$Y_{P/S}$: Yield coefficient of inosine to glucose; Q_S : Specific consumption rate of glucose; Q_P : Specific production rate of inosine.

2.3 柠檬酸钠对肌苷发酵过程中糖代谢途径关键酶活力的影响

对发酵过程的研究最后都会落实到细胞水平酶对反应速率的代谢调控,因而酶学研究对指导发酵过程优化和控制有重要意义。在肌苷生产菌中,分析葡萄糖在胞内的代谢途径,明显可以看到产物肌苷是通过磷酸戊糖途径(HMP)进而经由嘌呤途径而

合成的,这样葡萄糖的代谢流在 EMP、TCA 和 HMP 之间的合理分配就是产物最大生成的前提。下面通过酶学的方法来研究添加柠檬酸钠对糖代谢途径关键酶活力的影响。表 2 列出的是糖代谢途径关键酶相对比活的时序变化(各相对比活以不添加时比活为标准)。

表2 糖代谢途径关键酶相对比活的时序变化

Table 2 Relative specific activity of key enzymes in glucose metabolism during inosine fermentation

t/h	Key enzymes relative specific activity*				
	Glucokinase	Phosphofruktokinase	Pyruvate kinase	Citrate synthase	Glucose 6-phosphate dehydrogenase
12	0.805	0.392	0.603	0.091	1.142
24	1.13	0.578	0.668	0.12	1.21
32	0.97	0.425	0.61	0.103	1.26
40	1.1	0.722	0.587	0.107	1.19
48	1	0.306	0.645	0.083	1.05

* The ratio between the enzyme activity with sodium citrate addition and the enzyme activity without sodium citrate addition.

2.3.1 葡萄糖激酶:葡萄糖激酶(Glucokinase, GK, E. C. 2.7.1.1)是糖代谢过程中的关键酶。由于肌苷发酵培养基中主要碳源是葡萄糖,所以整个发酵过程中葡萄糖激酶始终保持较大的活力,两种培养条件下酶的活力没有明显变化,并且两者活力接近。说明柠檬酸钠对葡萄糖激酶的活力影响不大。

2.3.2 磷酸果糖激酶:磷酸果糖激酶(Phosphofruktokinase, PFK, E. C. 2.7.1.11)催化酵解途径中 6-磷酸果糖生成 1,6-二磷酸果糖的反应。从表中不同时间相对酶活数据分析,发现添加柠檬酸钠时 PFK 的活力比不添加时的活力要低得多。文献报道^[4]葡萄糖和柠檬酸盐的联合代谢会导致胞内 PEP 增加,而 PEP 是 PFK 的强烈抑制剂。由于 PFK 也是变构酶,柠檬酸、ATP 是它的变构抑制剂,胞内柠檬酸可通过加强 ATP 的抑制效应来抑制磷酸果糖激酶的活力。柠檬酸钠的添加降低了 PFK 的活力,而 PFK 又是影响 EMP 途径通量的关键酶,其活力降低则糖酵解过程减慢。对发酵过程的影响具体表现在葡萄糖的比消耗速率降低(表 1)。

2.3.3 丙酮酸激酶:丙酮酸激酶(Pyruvate Kinase, PK, E. C. 2.7.1.40)是 EMP 途径的第 3 个限速酶。对表中数据分析后可明显看出添加柠檬酸钠时,该酶平均比活比不添加时平均值要减少 38%。柠檬酸盐与葡萄糖的联合代谢会增加胞内 Ca^{2+} 的浓度^[4],从而强烈抑制 PK 的活力使糖酵解过程减慢。

2.3.4 柠檬酸合成酶:柠檬酸合成酶(Citrate synthase, E. C. 4.1.3.7)是 TCA 途径的关键酶。在添加柠檬酸钠时,该酶的活力比不添加时要低得多。原

因很明显,柠檬酸是三羧酸循环的中间产物,细胞内的柠檬酸含量高,意味着丰富的生物合成前体存在,葡萄糖无需为提供合成前体而降解。所以添加柠檬酸钠时该酶的活力很低。

2.3.5 6-磷酸葡萄糖脱氢酶:6-磷酸葡萄糖脱氢酶(Glucose 6-phosphate dehydrogenase, G-6-PDH, E. C. 1.1.1.49)是HMP的关键酶。从表中葡萄糖激酶相对比活可判断两种情况下葡萄糖在EMP和HMP的中总通量是一样的,而PFK,PK的数据又表明添加柠檬酸钠时EMP途径被抑制,所以可推测在添加柠檬酸钠时更多的葡萄糖在HMP途径中被消耗,从而保证了嘌呤合成途径的通量,所以肌苷产量大幅度增加。

3 结论

通过酶学研究表明柠檬酸钠的添加降低了EMP途径中关键酶PFK和PK的活力,从而引起糖酵解过程酶反应速率减慢,通量减少,同时HMP途径的关键酶6-磷酸葡萄糖脱氢酶的活力却有所增加,因此肌苷产量大幅度提高。枯草杆菌发酵生产肌苷的代谢流分析表明葡萄糖大部分是流向EMP途径^[10],通过调控使EMP途径葡萄糖代谢通量的减少,必然会导致HMP途径中葡萄糖代谢的通量增加,对发酵过程的影响表现为肌苷产量增加。本文的研究表明对主流代谢途径葡萄糖通量的调控,对目的产物肌苷的生成具有重要意义,能有效提高肌苷产量和糖苷转化率。

参 考 文 献

- [1] Muzzio T, Acevedo F. Theoretical yield in nucleotide production by fermentation. *Process Biochem*, 1985, **20**: 60 - 65.
- [2] Sauer U, Cameron D C, Bailey J E. Metabolic capacity of *Bacillus subtilis* for the production of purine nucleoside, riboflavin, and folic acid. *Biotech and Bioeng*, 1998, **59**(2): 227 - 238.
- [3] Majewski R A, Domach M M. Simple constrained-optimization view of acetate overflow in *E. coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, **35**: 732 - 738.
- [4] Akshay G, Jinwoon L, Michale M, et al. Metabolic fluxes, pool and enzyme measurements suggest a tighter coupling of energetics and biosynthetic reactions associated with reduced pyruvate kinase flux. *Biotechnol and Bioeng*, 1999, **64**(2): 129 - 134.
- [5] Postma E, Scheffers W A, van Dijken J P. Adaptation of the kinetics of glucose transport to environmental conditions in the yeast *Candida utilis* CBS 621 continuous-culture study. *J Gen Microbiol*, 1988, **134**: 1109 - 1116.
- [6] Alves A M C R, Euverink G J W, Bibb M J, et al. Identification of ATP-Dependent phosphofructokinase as a regulatory step in the glycolytic pathway of the *Actinomyces streptomycetes* coelicolor A3(2). *Appl Enviro Microbiol*, 1997, **63**(3): 956 - 961.
- [7] Malcovati M, Valentini G. AMP and fructose 6-phosphate activated pyruvate kinase from *E. coli*. *Methods Enzymol*, 1982, **90**: 170 - 179.
- [8] Fortnagel P, Freese E. Analysis of sporulation mutants. 2. Mutants blocked in the citric acid cycle. *J Bacteriol*, 1969, **95**: 1434 - 1438.
- [9] Horne R, Anderson W, Nordlie R. Glucose dehydrogenase activity of yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase. Inhibition by adenosine 5'-triphosphate and other nucleoside 5'-triphosphates and diphosphate. *Biochem*, 1970, **9**: 610 - 615.
- [10] 张 蓓. 代谢工程. 天津: 天津大学出版社, 2003, 166 - 167.

Effect of Sodium Citrate on The Growth Metabolism and Inosine Accumulation by *Bacillus subtilis*

LIU Xin-Xing CHEN Shuang-Xi CHU Ju* ZHUANG Ying-Ping ZHANG Si-Liang

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, ECUST, Shanghai 200237, China)

Abstract: The effects of sodium citrate on the growth metabolism and inosine accumulation by *Bacillus subtilis* were studied in this paper. When 0.2% sodium citrate was added into the basal medium, the inosine yield and the yield coefficient of inosine to glucose in the broth were increased 18% and 38% respectively. The analysis on the activities of some key enzymes during inosine fermentation revealed that the supplement of sodium citrate had profound effect on the activity of several key enzymes. The activities of Phosphofructokinase and Pyruvate Kinase were decreased remarkably, the flux of glycolysis pathway was thus cut down as well.

Key words: Inosine, Sodium citrate, Pyruvate kinase, Glycolysis flux